

平成23年 5月 27日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700374

研究課題名(和文)

マイネルト基底核の誘発する大脳可塑性が大脳皮質微小回路へ及ぼす作用の解明

研究課題名(英文)

Investigation of cortical microcircuit upon meynert nucleus-induced cortical plasticity

研究代表者

高田 則雄 (TAKATA NORIO)

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・研究員

研究者番号： 50415212

研究成果の概要(和文)：

麻酔下マウスのマイネルト基底核(NBM)とヒゲ刺激とを同時に行って大脳皮質において長期増強(LTP)を誘導し、その間の大脳皮質細胞群カルシウム(Ca²⁺)活動を二次元可視化解析した。この結果LTP誘導最中にグリア細胞がCa²⁺活動していることを発見した。さらに、このCa²⁺活動を抑制したところ、NBM刺激に対する神経細胞応答は正常にも関わらず、LTPが消失することを発見した。これらの結果は、LTP誘導にグリア細胞活動が必須であることを生きたままの動物で初めて示した点で重要である。

研究成果の概要(英文)：

Two-dimensional imaging analysis was performed on calcium (Ca²⁺) dynamics of cortical cells during long term potentiation (LTP) induced by combined stimulation to meynert nucleus (NBM) and whiskers of an anesthetized mouse. We found that cortical glial cells respond with Ca²⁺ surges during the LTP-induction. Moreover, depleting this Ca²⁺ activity led to loss of LTP while maintaining neuronal response to NBM stimulation intact. These results show for the first time in *in vivo* preparation that glial Ca²⁺ activity is indispensable for cortical LTP induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：マイネルト基底核、アセチルコリン、大脳皮質、長期増強、グリア細胞、イメージング、*in vivo*、2光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

コリン作動性神経核であるマイネルト基底核(NBM)から大脳皮質への投射には、

大脳皮質の広範な領域への投射(睡眠-覚醒制御に関与)と、大脳皮質の受容野ごとへの投射(皮質可塑性に関与)とがあると考えられている[1]。

NBM への刺激と体性感覚刺激とを同時に行うと、大脳感覚野において受容野拡大などの大脳可塑性が生じることが知られている[1]。NBM による大脳可塑性に関する従来の研究では、微小電極法や内在性光信号計測法が用いられてきた。それらの方法では単一の神経細胞活動もしくは神経細胞全体の平均的活動しか計測できない。そのため、NBM による大脳可塑性によって、微小回路網としての大脳皮質活動がどのように変化するか全く不明である。微小回路網としての活動変化を知るには、多数の神経細胞の活動を単一細胞レベルで同時に測定する必要があるからである。さらに、神経細胞の発火活動を指標とした従前の方法では、大脳可塑性時のグリア細胞の活動変化を検出できない。グリア細胞は脳情報伝達に関わる可能性が指摘されており、実際、グリア細胞は神経シナプスを包囲して情報伝達物質（アセチルコリンなど）を放出するだけでなく、情報伝達物質に対する受容体も持つ[2]。そのため、NBM が誘発する大脳可塑性を理解するには、グリア細胞の活動も知る必要がある。近年、2光子顕微鏡を用いた *in vivo* マウスの大脳皮質研究が盛んになっている[3]。2光子顕微鏡を用いれば、神経細胞だけでなくグリア細胞の活動も単一細胞レベルで同時に観察できる。ただし、これまでの *in vivo* 2光子顕微鏡を用いた大脳皮質活動の研究は、自発活動[4]や刺激応答[3]だけを対象としており、神経可塑性時の研究は無かった。

参考文献

- [1] Rasmusson (2000) Behav Brain Res. 115: 205-218
- [2] Volterra et al. (2005) Nat Rev Neurosci. 6:626-640
- [3] Schummers et al. (2008) Science 320:1638-43
- [4] Takata et al. (2008) PLoS ONE 3:1-14.

2. 研究の目的

本研究では、大脳皮質グリア細胞が皮質可塑性にどの程度関与しているのかを解明することを目的とした。そのために大脳皮質において皮質可塑性を誘導し、その前後および最中の大脳皮質グリア細胞の活動を解析した。具体的には、麻酔下マウスのマイネルト基底核（NBM）とヒゲ刺激とを同時に行うことで、大脳皮質可塑性を誘導した。グリア細胞を二次元可視化解析するために *in vivo* 2光子顕微鏡を用いた。本研究によって、グリア細胞活動がシナプス可塑性に無くてはならない役割を担うことを、生きたままの動物を用いて初めて実証できた。

3. 研究の方法

本実験は以下の3つの要素からなる：

- (1) 体性感覚刺激（ヒゲ刺激）に反応する皮質受容野を同定する。
- (2) 体性感覚刺激と NBM 刺激とを同時に行って、皮質受容野において可塑性を誘発する。
- (3) 大脳可塑性に伴うグリア細胞の活動変化を2光子顕微鏡で観察する。

実験方法として(1)では、皮質受容野の場所を同定するために、大脳皮質集合電位計測を行う。(2)では、NBM へ電極を刺入して NBM 刺激と体性感覚刺激とを同時に行うことで大脳可塑性を誘発する。(3)では、大脳皮質グリア細胞にカルシウム (Ca²⁺) 感受性蛍光色素を取り込ませた上で、大脳可塑性前後のグリア細胞集団の Ca²⁺活動を2光子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

体性感覚刺激と NBM 刺激とを同時に行って、皮質受容野において可塑性を誘発する手法を確立した。具体的にはヒゲ刺激と NBM 刺激とを同時に繰り返すことで、ヒゲ刺激に対する大脳皮質反応が増大する系を立ち上げた(図1)。ヒゲ刺激には、圧縮空気を用いた。ヒゲに対応する大脳皮質脳細胞に、カルシウム (Ca²⁺) 感受性蛍光色素を取り込ませ、それらの細胞（神経細胞およびグリア細胞）の Ca²⁺活動を2光子励起顕微鏡で観察した。

図1 : *in vivo* 2光子励起顕微鏡観察系

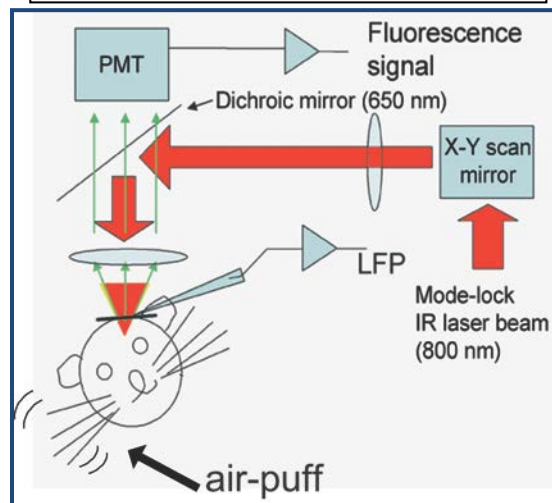
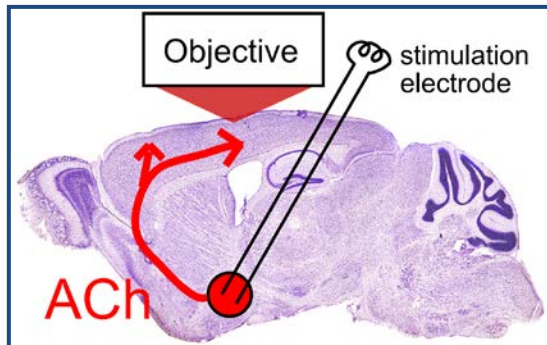


図2はニッスル染色した脳矢状断切片である。赤色の丸はNBMを表す。NBMにはコリン作動性神経細胞が存在しており、大脳皮質の広領域に軸索を投射しアセチルコリン (ACh) を放出する。双極電極を用いて定電流を流すことでNBMを刺激した。NBMに存在するコリン作動性神経細胞は凝集しているのではなく散在しているので、双極電極を用いることで適切な広さの領域を刺激できるように工夫した。“Objective”は2光子励起顕微鏡の対

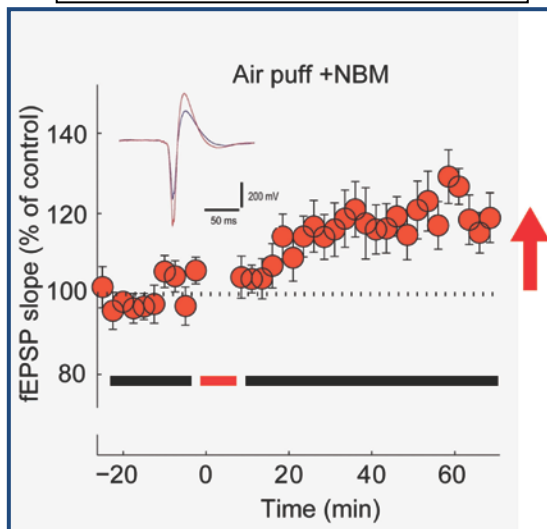
物レンズである。

図 2 : NBM 刺激の方法



以上の系を用いて、麻酔下ネズミの脳皮質に可塑性を誘導することに成功した (図 3)。ヒゲ刺激 (Air puff) と NBM 刺激 (NBM) とを繰り返して 6 分間与えたところ (図 3 赤線)、ヒゲ刺激に対する脳波反応 (局所集合電位) が 1 時間以上に渡って増大した。

図 3 : 脳皮質可塑性を誘導した



グリア細胞が皮質可塑性に関与しているかどうか解明するために、2光子励起顕微鏡観察を行って、皮質可塑性最中のグリア細胞活動を細胞内 Ca^{2+} を指標として観察した (図 4)。その結果、LTP の誘導最中 (図 5 赤線) にグリア細胞が活発にカルシウム活動していることを発見した (図 5)。グリア細胞の Ca^{2+} 活動は、ヒゲ刺激と NBM 刺激とを同時に与えた初期に特に大きく、蛍光強度上昇割合は 200%前後に達した。その後も、グリア細胞の Ca^{2+} 上昇は上昇したままの状態を維持し、ヒゲと NBM との同時刺激を終了したところ、グリア細胞の Ca^{2+} 濃度も定常状態へ戻った。とをさらに、グリア細胞のカルシウム活動に必須な蛋白質を欠損させた遺伝子改変マウス [KOマウス] を用いて同様の計測を

図 4 : 生きた動物の脳皮質グリア細胞

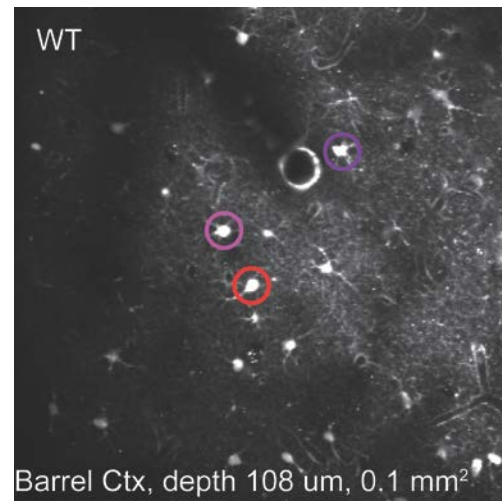
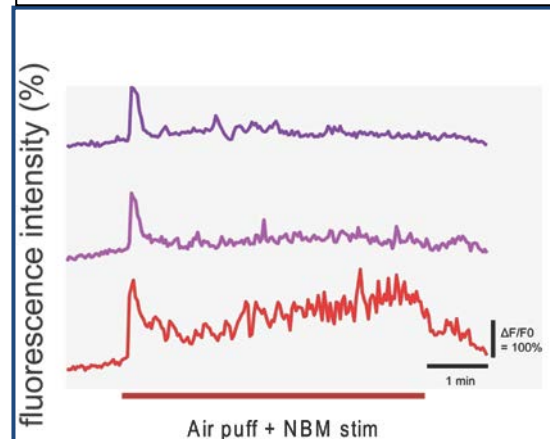


図 5 : 皮質可塑性誘導中にグリア細胞が活発に Ca^{2+} 活動することを発見した



行った。この結果 KOマウスにおいてグリア細胞のカルシウム活動が消失していることを確認した。驚くべき事に KOマウスにおいて NBM 刺激に対する神経細胞の応答は正常にも関わらず、NBM 刺激とヒゲ刺激とを同時に与えても LTP は生じないことを発見した。これらの結果は LTP の誘導にグリア細胞のカルシウム活動が必須であることを示唆する。本研究は、皮質可塑性に神経細胞のみならずグリア細胞の活動が必要であることを、生きたままの動物で初めて示した点で重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Megumi Kaneko, Kazuhiko Yamaguchi, Mototsugu Eiraku, Motohiko Sato, Norio Takata, Yoshimoto Kiyohara, Masayoshi Mishina, Hajime

Hirase, Tsutomu Hashikawa, Mineko Kengaku. Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. PLoS ONE, in press, 2011, 査読有り。

〔学会発表〕(計4件)

① Norio TAKATA, Tsuneko MISHIMA, Chihiro HISATSUNE, Etsuko EBISUI, Katsuhiko MIKOSHIBA, Hajime HIRASE. The first evidence of astrocytic contribution to a sensory induced synaptic plasticity in the somatosensory cortex *in vivo*, 2010.12.1, シェラトン都ホテル東京

② Norio TAKATA, Tsuneko MISHIMA, Chihiro HISATSUNE, Etsuko EBISUI, Katsuhiko MIKOSHIBA, Hajime HIRASE. Astrocytic contribution of a sensory induced synaptic plasticity in the somatosensory cortex, 2010.11.16, San Diego, USA.

③ Norio TAKATA, Tsuneko MISHIMA, Chihiro HISATSUNE, Etsuko EBISUI, Katsuhiko MIKOSHIBA, Hajime HIRASE. The first evidence of astrocytic contribution to a sensory induced synaptic plasticity in the somatosensory cortex *in vivo*, 内藤コンファレンス, 2010.10.6, 湘南国際村センター

④ 高田則雄、平瀬肇. 前脳基底部コリン作動性神経核は脳皮質アストロサイトを活性化する、日本神経学会、2009.9.17、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 則雄 (TAKATA NORIO)

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・研究員
50415212

(2) 研究協力者

平瀬 肇 (HIRASE Hajime)

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：90392084

矢作 和子

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・技術員
研究者番号無し